

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.  
C12P 19/00

(11) 공개번호  
(43) 공개일자

특2003-0037005  
2003년05월12일

(21) 출원번호	10-2001-0067964
(22) 출원일자	2001년11월01일
(71) 출원인	주식회사 태평양 대한민국 140-871 서울 용산구 한강로2가 181
(72) 발명자	영명훈 대한민국 449-845 경기도용인시수지읍죽전리832번지벽산아파트109동403호 우광식 대한민국 449-904 경기도용인시기흥읍보라리314-1 남춘자 대한민국 449-904 경기도용인시기흥읍보라리314-1 김영소 대한민국 156-761 서울특별시동작구대방동대림아파트106동1801호 성대석 대한민국 130-781 서울특별시동대문구청량리1동미주아파트4동817호 김덕희 대한민국 137-030 서울특별시서초구잠원동장원훼미리아파트2동902호 장이섭 대한민국 449-846 경기도용인시수지읍풍덕천리703동보아파트102동1104호 강학희 대한민국 463-747 경기도성남시분당구분당동(샛별마을)동성아파트204동1405호
(74) 대리인	윤동열 이선희
(77) 심사청구	있음
(54) 출원명	인삼 사포닌으로부터 화합물 K 및 진세노사이드 F1을제조하는 방법

요약

본 발명은 인삼의 주요 대사산물인 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올(화합물 K) 및 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올(진세노사이드 F1)을 제조하는 방법에 관한 것으로, 인삼으로부터 제조된 정제 사포닌을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 후 페니실린속에서 분리한 나린지나제 및 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 중 적어도 하나와 반응시킴으로써 고수율의 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에서는 효소를 이용한 간단한 공정을 통해 인삼 정제 사포닌으로부터 주요한 약리효능을 나타내는 인삼사포닌의 대사산물인 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 대량으로 생산한다.

대표도

도2

색인어

사포닌 \* 화합물 K \* 진세노사이드 F1 \* 나린지나제 \* 펙티나제 \* 에탄올 \* 에틸아세테이트 \* 인삼

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 홍삼 정제 사포닌의 고속액체 크로마토그램

도 2는 효소반응 후 반응물의 고속액체 크로마토그램

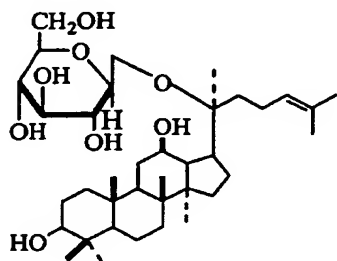
발명의 상세한 설명

발명의 목적

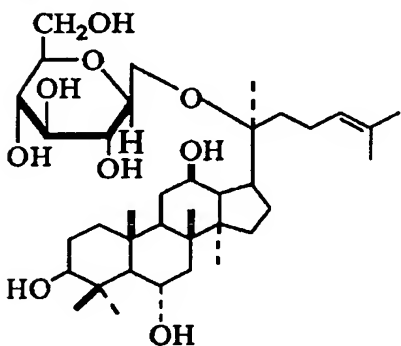
발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 다음 화학식 1로 표현되는 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올(이하 "화합물 K"라 한다) 및 화학식 2로 표현되는 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사트리올(이하 "진세노사이드 F1"이라 한다)의 제조방법에 관한 것으로, 인삼으로부터 제조된 정제 사포닌을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 후 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 및 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 중 적어도 하나와 반응시킴으로써 고수율의 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

화학식 1



화학식 2



상기 화학식 1로 표현되는 화합물 K 및 화학식 2로 표현되는 진세노사이드 F1은 인삼 사포닌의 인체내 주요 대사산물로 장내세균에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다(Hasegawa, H., Sung, J.H., Matsumiya, S., Uchiyama, M., (1996) *Planta Medica* 62, 453-457).

인삼 특유의 약리활성 사포닌인 진세노사이드 유도체들은 담마란계의 트리테르페노이드인 프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올에 글루코오스, 람노스, 아라비노스 또는 자일로스와 같은 당류가 결합한 화합물로서 지금까지 고려인삼에서 30여종의 유도체들이 밝혀졌다. 또한 인삼 사포닌은 어글리콘에 결합되어 있는 당의 종류나 결합된 당류의 수 또는 결합위치에 따라 약리효능이 각각 다르다는 것이 이미 밝혀져 있으며, 인삼 중 함량이 많고 분리하기가 용이한 주요 사포닌 성분의 약리효능에 대해서는 많은 연구가 행해져 왔으나 주로 홍삼에만 존재하는 미량 사포닌이나 인체에 섭취시 생성되는 대사산물 사포닌의 약리효능에 관한 연구는 상대적으로 적은 편이다.

인삼의 사포닌 성분 중 프로토파낙사디올에 당(글루코즈)이 하나 붙은 화합물 K, 프로토파낙사트리올에 당(글루코즈)이 하나 붙은 진세노사이드 Rh1, 진세노사이드 Rh2, 진세노사이드 F1 등은 암세포증식 억제작용, 종양증식 억제작용, 항암제의 항암활성 증대작용등의 약리작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근에는 사포닌의 대사물에 관한 연구가 진행되면서, 인삼 사포닌의 약효는 사포닌 자체라기보다는 장내세균의 대사물이 활성의 본체임이 알려지고 있다.

이 유용한 인삼의 대사산물의 하나인 화합물 K의 제조방법으로서, 이미 토양균 아스퍼질러스니가(*Aspergillus niger*)

), 쥐의 장내균 및 사람 분변

유래 장내균을 이용한 방법이 보고되었고(한국특허 제178863호), 사포닌 혼합물을 미생물에서 분리한 베타갈락토시다제, 나린지나제와 락타아제 등과 반응시켜 홍삼의 미량 성분인 진세노사이드 Rh1과 Rh2를 얻는 방법이 보고되고 있다(한국특허 제186757호, 한국공개특허 제00-45694호).

인삼의 부위와 종류에 따라 약간의 차이를 보이나 인삼에는 프로토파낙사디올계 사포닌과 프로토파낙사트리올계 사포닌이 1:1~3:1의 비로 함유되어 있다. 이러한 프로토파낙사디올계와 프로토파낙사트리올계 사포닌들은 각기 다른 효능을 가지고 있으면서도 서로 상호보완작용을 통해 효과를 배가시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 종래의 방법들은 대부분 프로토파낙사디올계 사포닌들을 분리하여서 화합물 K를 생성하는 방법이며 프로토파낙사트리올계 사포닌으로부터는 진세노사이드 F1을 제조하지 못하는 문제점이 있었다. 또한 화합물 K를 제조하기 위한 종래의 방법으로 토양균을 이용할 경우에는 2주 이상의 배양기간을 필요로 하고, 사람 분변유래의 장내세균을 이용할 경우에는 화합물 K 뿐만 아니라 다른 중간체들이 제조되며, 베타갈락토시다제, 나린지나제 및 락타아제 등의 효소를 단순히 반응시키는 경우에는 화합물 K와 진세노사이드 F1이 소량 생성되고 진세노사이드 Rh1과 Rh2가 주로 생성되는 문제점이 있었다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명에서는 반응시간이 길고 수율이 낮은 장내세균이 아닌 효소를 사용한 간단한 공정에 의해 고수율의 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법을 제공하고자 한다. 보다 상세히 설명하면 본 발명에서는 사포닌을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 후 당결합을 분해하는 효소인 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 및 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 중 적어도 하나와 반응시킴으로써 고수율의 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

#### 발명의 구성 및 작용

본 발명은 인삼의 주요 대사산물인 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법에 관한 것으로, 인삼으로부터 제조된 정제 사포닌을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 후 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 및 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 중 적어도 하나와 반응시킴으로써 고수율의 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의한 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 제조방법을 보다 상세히 설명하면 다음과 같다.

먼저 인삼 정제 사포닌 0.1~20 중량%를 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 넣고 용해한다.

여기에서 사용되는 용매로는 pH 3~8, 바람직하게는 pH 4~6 범위인 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액을 사용한다.

본 발명에서는 수성용매로 시트레이트 완충용액을 사용하고, 유기용매로는 특별히 제한을 받지 않으며, 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 저급 알코올과 톨루엔, 에틸아세테이트, 클로로포름 등을 사용한다. 유기용매는 수성용매에 0.1~50 중량% 정도 혼합되는 것이 좋으나, 유기용매의 혼합비율은 반응에 사용되는 고농도의 정제 사포닌을 용해시킬 수 있고, 효소의 활성을 저하시키지 않는 범위에서 사용한다. 최적의 용매조건은 수성완충용액만 사용하는 것보다 유기용매를 적절히 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다. 이와 같이 유기용매를 혼합하여 사용하는 것은 효소 반응에 의해 생성되는 중간 반응물의 용해도를 증가시킴으로써 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율을 향상시키는 것으로 여겨진다. 더욱 바람직하게는 에탄올과 에틸아세테이트를 5~25 중량% 첨가 한 유기용매를 사용하는 것이 좋다.

그런 다음 상기 혼합액에 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 및 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 중 적어도 하나를 기질대비 1~1000 중량% 첨가한 후 20~60℃에서 1~72시간을 반응시킨 후 비등 수욕조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성시켜 화합물 K 및 진세노사이드 F1이 다량 함유된 반응액을 얻는다.

이때 효소를 첨가하는데 있어서, 효소의 불활성화가 일어나지 않는 방법이라면 특별히 제한을 받지 않으며 나린지나제, 펙티나제 또는 나린지나제와 펙티나제를 동시에 반응시키거나 한가지 효소를 먼저 반응시킬 수 있다. 즉, 일단 한가지 효소를 먼저 반응시킨 다음 시간이 경과한 후 다른 한가지 효소를 한번에 또는 서서히 첨가하여 반응시킬 수 있고, 바람직하게는 펙티나제를 먼저 반응시킨 후 일정시간이 경과한 다음 나린지나제를 서서히 첨가하는 방법이 좋다.

또한 반응온도는 효소의 불활성화가 일어나지 않는 온도 즉, 나린지나제의 경우에는 20~80℃, 펙티나제의 경우에는 20~60℃, 바람직하게는 나린지나제는 30~50℃, 펙티나제는 30~40℃에서 1~120시간, 바람직하게는 36~72시간 교반하면서 반응한다.

마지막으로 반응액에 에틸아세테이트를 1:1로 넣고 3회 추출한 후 농축한 다음 실리카겔 칼럼크로마토그래피(클로로포름:에탄올=9:1)에 의해 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 얻는다.

본 발명에 의해 제조된 생성물들은 아래와 같은 특성을 나타내어 화합물 K 및 진세노사이드 F1으로 동정하였다.

#### < 화합물 K의 물리화학적 성상 >

성상 : 백색의 미세 결정

Positive FAB-MS : 623[M+H]<sup>+</sup>

#### < Ginsenoside F1의 물리화학적 성상 >

성상 : 백색의 미세 결정

Positive FAB-MS : 639[M+H]<sup>+</sup>

[표 1]

화합물 K와 진세노사이드 F1의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR 데이터

화합물 K			진세노사이드 F1		
<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H
C-1	40.030	0.774(3H, S, Me-19)	C-1	40.121	0.955(6H, S, Me-18,19)
C-2	27.999	0.913(3H, S, Me-18)	C-2	27.748	1.080(3H, S, Me-29)
C-3	78.212	0.923(3H, S, Me-30)	C-3	78.22	1.283(3H, S, Me-28)
C-4	40.030	0.959(3H, S, Me-28)	C-4	40.493	1.393(3H, S, Me-21)
C-5	57.272	1.016(3H, S, Me-29)	C-5	62.515	1.616(6H, S, Me-27,30)
C-6	19.416	1.280(3H, S, Me-21)	C-6	68.871	1.673(3H, S, Me-26)
C-7	35.853	1.616(3H, S, Me-27)	C-7	36.596	4.020(1H, ddd-like, H-6)
C-8	40.968	1.676(3H, S, Me-26)	C-8	41.996	4.585(1H, d, 8.1 Hz, H-1'-20-Glu)
C-9	49.77	4.612(1H, d, 7.8 Hz, H-1'-20-Glu)	C-9	49.383	5.077(1H, t, 6.9 Hz, H-24)
C-10	38.171	5.102(1H, t, 6.9 Hz, H-24)	C-10	40.121	-
C-11	31.641	-	C-11	30.894	-
C-12	71.185	-	C-12	71.174	-
C-13	51.064	-	C-13	50.442	-
C-14	52.491	-	C-14	52.347	-
C-15	30.765	-	C-15	30.894	-
C-16	27.194	-	C-16	27.183	-
C-17	53.147	-	C-17	53.09	-
C-18	16.244	-	C-18	16.134	-
C-19	16.126	-	C-19	16.134	-
C-20	84.936	-	C-20	84.871	-
C-21	22.854	-	C-21	22.808	-
C-22	36.653	-	C-22	31.611	-
C-23	24.254	-	C-23	24.212	-
C-24	125.853	-	C-24	125.842	-
C-25	132.288	-	C-25	132.288	-
C-26	25.878	-	C-26	25.885	-
C-27	17.948	-	C-27	17.951	-
C-28	28.625	-	C-28	31.448	-
C-29	16.718	-	C-29	17.223	-
C-30	17.189	-	C-30	17.674	-
C-1'	98.303	-	C-1'	98.28	-
C-2'	75.397	-	C-2'	75.37	-
C-3'	79.529	-	C-3'	79.506	-
C-4'	71.925	-	C-4'	71.784	-
C-5'	77.947	-	C-5'	77.92	-
C-6'	62.519	-	C-6'	62.109	-

이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다.

#### [참고예 1] 인삼 정제 사포닌의 제조

홍삼, 백삼, 수삼, 미삼 또는 이들의 인삼열 2kg에 물, 물을 포함한 메탄올 또는 메탄올 4ℓ를 넣고, 3회 환류 추출한 후, 15℃에서 6일간 침적시켰다. 그 후, 여과포 여과와 원심분리를 통해 잔사와 여액을 분리하고, 분리된 여액을 감압농축하여 얻은 엑기스를 물에 현탁한 후에, 에테르 1ℓ로 5회 추출하여 색소를 제거하고, 수층을 1-부탄올 500ml로 3회 추출하였다. 이로부터 얻은 총 1-부탄올층을 5% KOH로 처리한 다음 증류수로 세척한 뒤, 감압농축하여 1-부탄올 엑기스를 얻고, 이를 소량의 메탄올에 녹인 다음, 대량의 에틸아세테이트에 추가하여, 생성된 침전물을 건조함으로써, 인삼 정제 사포닌 추출물 40~80g을 얻었다.

#### [실시예 1]

인삼 정제 사포닌 10g을 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 1000ml에 용해시키고, 여기에 펙티나제 효소 15g을 첨가하여 30℃ 수욕상에서 교반시키면서 반응시켰다. 반응 12시간부터 36시간까지 12시간마다 메탄올 100ml와 나린지나제 2.5g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 교반시키면서 48시간까지 반응을 진행시켰다. 반응이 종료되면 10분간 가열한 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출하고 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로마토름:메탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 3.2g과 진세노사이드 F1 1.5g을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 87.8%이었다.

## [실시예 2]

인상 정제 사포닌 5g을 시트레이트 완충용액(pH 5.5) 500ml에 용해시키고, 여기에 펙티나제 10g을 첨가하여 30℃ 수욕상에서 24시간동안 교반시키면서 반응시킨 후에 비등 수욕조에서 가열하여 효소를 불활성시켰다. 여기에 에탄올 85ml와 나린지나제 5g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 24시간동안 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 반응이 종료되면 10분간 가열한 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 1.25g과 진세노사이드 F1 0.68g을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 72%이었다.

## [실시예 3]

인상 정제 사포닌 2g을 20ml 에틸아세테이트를 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 200ml에 용해시키고, 여기에 나린지나제 4g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 24시간동안 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 이 후에 펙티나제 4g을 첨가하여 30℃ 수욕상에서 24시간동안 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 반응이 종료되면 10분간 가열한 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 360mg과 진세노사이드 F1 240mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 56%이었다.

## [실시예 4]

인상 정제 사포닌 2g을 200ml의 시트레이트 완충용액(pH 4.0)에 용해시키고, 여기에 나린지나제 2g과 펙티나제 4g을 첨가하여 37℃ 수욕상에서 교반시키면서 반응시켰다. 8시간 간격으로 48시간까지 반응액에 에틸아세테이트 15ml를 첨가하면서 56시간 반응을 진행시켰고, 반응이 종료된 다음 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 400mg과 진세노사이드 F1 200mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 56%이었다.

## [실시예 5]

인상 정제 사포닌 1g을 15ml 에탄올을 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 100ml에 용해시키고, 여기에 나린지나제 0.2g과 펙티나제 0.4g을 넣고, 8시간 간격으로 각각의 효소를 0.2g, 0.4g씩 첨가하여 37℃ 수욕상에서 48시간동안 교반시키면서 반응시켰다. 반응이 종료되면 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 120mg과 진세노사이드 F1 80mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 37.4%이었다.

## [실시예 6]

인상 정제 사포닌 3g을 20ml 에틸아세테이트를 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 100ml에 용해시키고, 여기에 나린지나제 3g과 펙티나제 3g을 첨가하여 37℃ 수욕상에서 64시간동안 교반시키면서 반응시켰다. 반응이 종료되면 열수중에서 10분간 가열한 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 300mg과 진세노사이드 F1 190mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 30%이었다.

## [실시예 7]

인상 정제 사포닌 2g을 100ml의 시트레이트 완충용액(pH 5.5)에 용해시키고, 여기에 펙티나제 6g을 첨가하여 30℃ 수욕상에서 48시간동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에테르로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 50mg과 진세노사이드 F1 20mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 6.5%이었다.

## [실시예 8]

인상 정제 사포닌 2g을 10ml 톨루엔을 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 100ml에 용해시키고, 여기에 펙티나제 2g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 56시간동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 50mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 4.7%이었다.

## [실시예 9]

인상 정제 사포닌 1g을 10ml 에탄올을 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 100ml에 용해시키고, 여기에 나린지나제 1g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 36시간동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 60mg과 진세노사이드 F1 20mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 14.9%이었다.

## [실시예 10]

인상 정제 사포닌 1g을 100ml의 시트레이트 완충용액(pH 5.5)에 용해시키고, 여기에 나린지나제 2g을 첨가하여 50℃ 수욕상에서 56시간동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(크로로포름:에탄올=9:1)로 분리하여 화합물 K 40mg과 진세노사이드 F1 15mg을 얻었고, 이때 생성된 화합물 K 및 진세노사이드 F1의 수율은 10.3%이었다.

상기의 실시예 1 내지 실시예 10의 수율은 9.1%인 정제 사포닌 10g을 100% 전환시 최종 생성물(화합물 K와 진세노사이드 F1)이 5.35g(수율 100%)이었을 때, 각 실시예 1 내지 실시예 10의 최종 생성물을 인삼 정제 사포닌 10g이 반응된 것으로 환산하여 계산하였다. 예를 들면 실시예 1의 경우 인삼 정제 사포닌 10g이 반응하여 생성된 최종 생성물은 4.7g이므로 수율은  $4.7/5.35 \times 100 = 87.8\%$ 이었으며, 실시예 2의 경우 인삼 정제 사포닌 5g이 반응하여 최종 생성물은 1.93g 이었는데, 인삼 정제 사포닌 10g으로 환산하면 3.86g이므로 수율은  $3.86/5.35 \times 100 = 72\%$ 이 되었다.

#### [시험예 1] 효소반응 후의 홍삼사포닌의 함량 변화

홍삼으로부터 참고예 1의 방법으로 홍삼정제 사포닌을 제조하고 실시예 1의 방법으로 효소반응을 진행시킨 후 효소반응 전과 효소반응 후의 변화를 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다.

#### [표 2]

기준 : 정제사포닌 5mg/1ml(5000ppm)(HPLC)

	보유시간(min)	함량(ppm)
진세노사이드 Rg1 + Re	12.302	914(18.28%)
진세노사이드 Rb1	17.708	1306(26.12%)
진세노사이드 Rc	19.550	388(7.76%)
진세노사이드 Rb2	18.580	810(16.2%)
진세노사이드 Rd	21.933	180(3.6%)
합계(기타 사포닌 포함)		4200(84%)

효소반응 전의 홍삼정제 사포닌 함량을 측정한 결과를 상기 표 2 및 도 1에 나타내었고, 효소반응 후의 홍삼정제 사포닌 함량을 측정한 결과를 도 2에 나타내었다.

도 1 및 도 2에 나타난 것과 같이 효소 반응 전에 홍삼사포닌의 대부분을 구성하고 있는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg1, Re 등이 효소반응 후에는 화합물 K와 진세노사이드 F1으로 전환되었음을 알 수 있다.

#### 발명의 효과

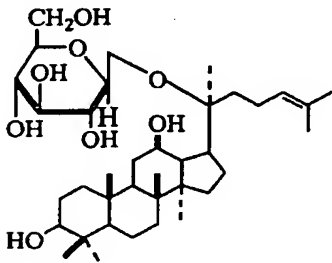
이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 효소를 이용한 간단한 공정을 통해 인삼 정제 사포닌으로부터 주요한 약리효능을 나타내는 인삼사포닌의 대사산물인 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 대량으로 생산할 수 있었다.

#### (57) 청구의 범위

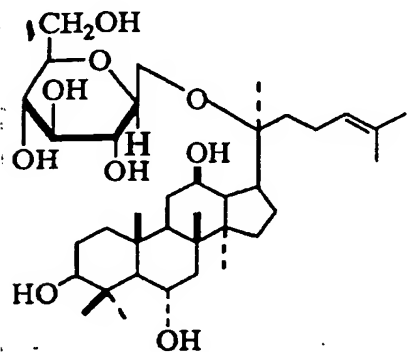
##### 청구항 1.

인삼 정제 사포닌을 물이나 완충용액과 같은 수성용매 또는 물이나 완충용액과 같은 수성용매와 유기용매의 혼합액에 용해시킨 다음 나린지나 제 및 펙티나제 중 적어도 하나 이상을 첨가하여 반응시킴으로써 화학식 1로 표현되는 화합물 K 및 화학식 2로 표현되는 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

#### [화학식 1]



#### [화학식 2]



#### 청구항 2.

제 1항에 있어서, 나린지나제가 페니실리움속에서 분리한 효소이고, 펙티나제가 아스퍼질러스속에서 분리한 효소인 것을 특징으로 하는 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

#### 청구항 3.

제 1항에 있어서, 유기용매로 에틸아세테이트, 톨루엔, 에테르, 에탄올 및 메탄올등의 저급알코올을 사용하고 그 함유량이 완충용액이나 수성용매의 중량을 기준으로 60 중량% 이하인 것을 특징으로 하는 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

#### 청구항 4.

제 3항에 있어서, 유기용매가 에탄올 및 에틸아세테이트가 5~25 중량% 함유된 유기용매인 것을 특징으로 하는 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

#### 청구항 5.

제 1항에 있어서, pH 3.0~8.0 수성완충용액에 기질대비 1~1000 중량%의 펙티나제를 첨가하여 20~60℃에서 1~48시간 반응시킨 후 반응액 기준으로 1~60 중량%의 유기용매와 기질대비 1~500 중량%의 나린지나제를 1~24시간 간격으로 1~10회 첨가하여 1~48시간 동안 반응시켜 생성시키는 것을 특징으로 하는 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

#### 청구항 6.

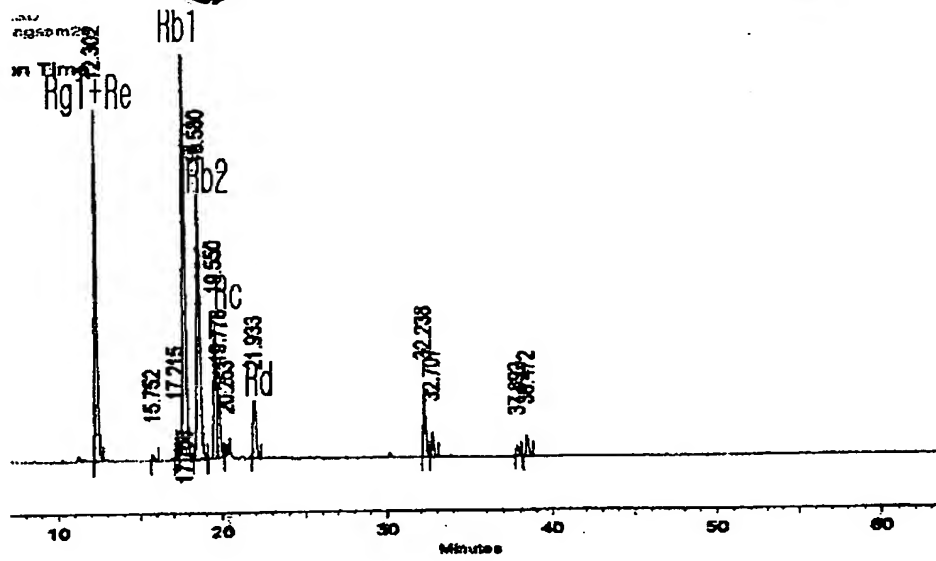
제 1항에 있어서, pH가 3.0~8.0인 수성완충용액에 1~500 중량%의 나린지나제를 첨가하여 30~50℃에서 1~48시간 반응시킨 후 반응액 기준으로 1~60 중량%의 유기용매와 기질대비 1~1000 중량%의 펙티나제를 1~24시간 간격으로 1~10회 첨가하여 1~48시간 동안 반응시켜 생성시키는 것을 특징으로 하는 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

#### 청구항 7.

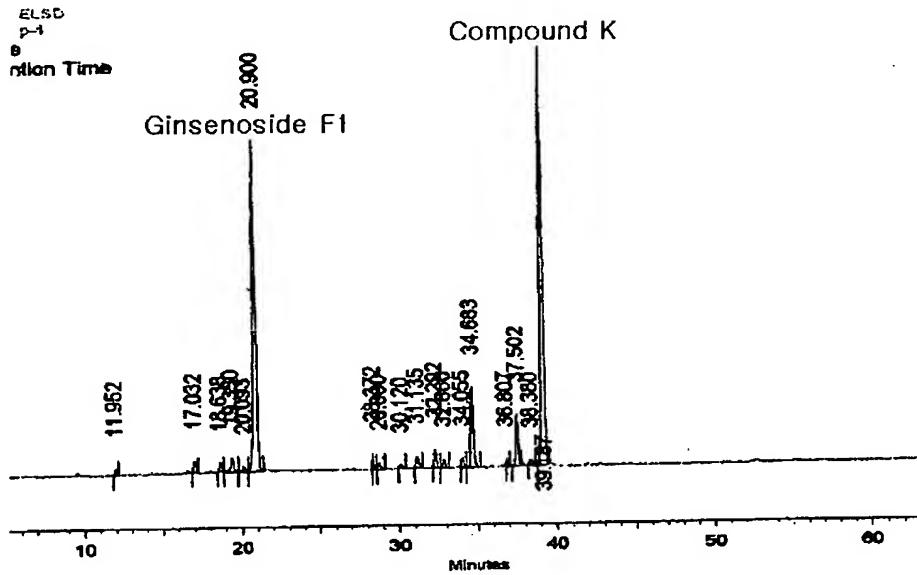
제 1항에 있어서, pH가 3.0~8.0인 수성완충용액에 1~500 중량%의 나린지나제 및 1~1000 중량%의 펙티나제를 동시에 첨가하여 20~80℃에서 1~48시간 동안 반응시켜 생성시키는 것을 특징으로 하는 화합물 K 및 진세노사이드 F1을 제조하는 방법.

도면

도면 1



도면 2





[KP-2003-0037005]

This invention relates to 20-O- $\beta$ -D-glucopyranocyl-20(S)-protopanaxadiol as the main metabolic products of ginseng and the method for preparing 20-O- $\beta$ -D-glucopyranocyl-20(S)-protopanaxadiol.

In particular, it relates to the method for preparing 20-O- $\beta$ -D-glucopyranocyl-20(S)-protopanaxadiol and ginsenoside F1 to highly yield by reacting with at least one of naringinase separated from *Penicillium* and pectinase separated from *Aspergillus* after dissolving refined-saponin produced from ginseng in hydrogenous solvents such as waters or buffer solutions or in mixture of organic solvents and hydrogenous solvents such as waters or buffer solutions.